

# SLEDOVÁNÍ ZMĚNY AKUTNÍ TOXICITY SYNTETICKÉHO BARVIVA DISPERSE BLUE 3 V PRŮBĚHU BIODEGRADACE

**Monika Holešová, Hana Sezimová**

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,  
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, holesova.monika@seznam.cz*

## **Abstrakt**

Cílem této studie je zjistit toxické účinky syntetického barviva Disperse blue 3 a jeho biodegradačních produktů testem inhibice růstu kořene na semenech *Sinapis alba*. Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* je vyhodnocována po 72 hodinách inkubace v termostatu. Pomocí koncentračních řad je stanoven inhibiční účinek vzorku jako hodnota IC50. Biodegradace je prováděna v rotačním diskovém bioreaktoru pomocí ligninolytické houby rodu *Pleurotus ostreatus*. U vzorku meziprojektu byla pozorována mírně vyšší toxicita než u biodegradace houbou *Irpex lacteus*.

**Klíčová slova:** syntetická barviva; biodegradace; Disperse blue 3; ligninolytické houby; *Sinapis alba*

## **Úvod**

Ročně se vyrobí a spotřebuje velké množství syntetických barviv v nejrůznějších průmyslových odvětvích. Barviva jsou vypouštěna do životního prostředí společně s odpadními vodami, což způsobuje vážné problémy v životním prostředí, neboť tyto látky působí toxicky a mnohé jsou dokonce karcinogenní. Navíc, odpadní vody ústící do povrchových vod využívaných k zavlažování mohou působit škodlivě na půdu, zvyšovat koncentraci N, P, K a Na, v důsledku toho měnit hodnotu pH. Rovněž může docházet ke kontaminaci podzemních vod [1].

Barviva a jiné sloučeniny jsou běžnými metodami používanými v odpadních čistírnách obtížně biologicky rozložitelné [3]. Syntetická barviva jsou navržena tak, aby byla odolná vůči světlu, působení vody a oxidačních činidel, proto například zpracování odpadních vod pomocí aktivovaného kalu zde nepřichází v úvahu [1]. K eliminaci barviv lze využít fyzikální a chemické postupy např. adsorpce, koncentrace, chemická transformace a spalování. Tyto metody mají však svá omezení, jako jsou vysoké provozní náklady, velké množství kalů, které v průběhu těchto procesů vznikají a v některých případech mohou vznikat i nebezpečné vedlejší produkty [2]. Z toho důvodu se hledají jiné alternativy degradace. Do popředí se dostávají biotechnologie využívající nejrůznější organismy k biologickému rozkladu.

Bylo prokázáno, že houby bílé hniloby mají schopnost degradovat širokou skupinu obtížně rozložitelných látek. Tyto houby produkují řadu extracelulárních enzymů jako například ligninperoxidasu, mangan-dependentní peroxidasu, lakasu a další, čímž dokáže degradovat a mineralizovat například pesticidy, polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, syntetická barviva a syntetické polymery [4].

Cílem této práce je sledování účinnosti biodegradace syntetického barviva Disperse blue 3 (DB3) pomocí ligninolytické houby rodu *Pleurotus ostreatus* využitím testu toxicity na *Sinapis alba*.

## **Materiál a metody**

### *Použitý organismus*

*Sinapis alba* (Hořčice bílá) patří do čeledi brukvovitých. Je to jednoletá bylina, v půdě setrvává tenkým kořínkem, dorůstá výšky až 1,2m, má výrazné žluté oboupohlavné květy a

pěstuje se především pro semeno, které se používá v potravinářském průmyslu. Semeno je poměrně velké 1,5 až 4 mm, je okrově žluté nebo bílo-žluté a kulovitěho tvaru [5].

Test na semenech hořčice bílé se využívá ke stanovení toxického účinku látek obsažených v odpadních vodách nebo ve vodném výluhu z tuhých odpadů, kdy se pozoruje klíčivost semen a růst kořene v počátečních stádiích vývoje rostlin [6].

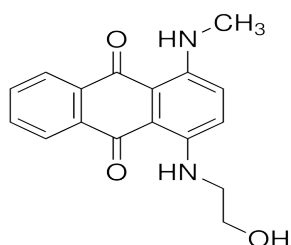
### Chemikálie

Testováno bylo syntetické barvivo Disperse blue 3 (Obr. 1.), které je hojně využíváno k barvení syntetických vláken a hmot typů nylonů, silonů, polyesterů, acetátů, ale také například k barvení kožešin.

K ředění se používá ředící voda připravená podle požadavků ČSN EN ISO 746-2 a ČSN EN ISO 6341 (Tab. 1.).

**Tabulka 1.** Složení ředící vody

Zásobní roztok	Chemikálie	Koncentrace v g/l
I	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	117,6
II	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	49,3
III	NaHCO <sub>3</sub>	25,9
IV	KCl	2,3



**Obrázek 1.** Strukturní vzorec Disperse blue 3

### Test toxicity na semenech *Sinapis alba*

Test byl proveden podle Metodického pokynu odboru odpadů [6]. Semena *Sinapis alba* se nechala den dopředu předklíčit. Ze zásobních roztoků a destilované vody byla připravena ředící voda, která se nechala 24 hod sytit vzdušným kyslíkem a potom bylo zkontrolováno pH, které by mělo být  $7,8 \pm 0,2$ . Případná úprava se provádí roztoky 1M NaOH nebo 1M HCl. Test probíhá na Petriho miskách, kdy se na dno každé misky vloží 1 vrstva filtračního papíru, na který se nanáší cca 5ml testovaného roztoku. Na zvlhčený filtrační papír se pinzetou umístí 30 semen, misky se uzavřou víčkem a uloží do termostatu při teplotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  bez přístupu světla na dobu 72 hod.

K vyhodnocení testu se přistupuje po 72 hodinách, kdy se každý výsledek zaznamenal na fotoaparát a pak byly proměřeny délky všech kořenů semen v programu Image Tool. Neměří se hypokotyl, ale pouze kořen, který je opatřen drobným vlášením, na rostlině dobře pozorovatelným. Ze získaných údajů byla vypočtena inhibice růstu kořenů v % v dané koncentraci oproti kontrole.

Vzorec pro výpočet % inhibice růstu kořene v testované látce oproti kontrole:

$$I_i = \frac{L_c - L_v}{L_c} \cdot 100$$

$I_i$  – inhibice růstu kořene v % v dané koncentraci, je-li  $I_i < 0$ , jedná se o stimulaci růstu

$L_c$  – průměrná délka kořene v kontrole (mm)

$L_v$  – průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

Koncentrace, při které došlo k inhibici růstu, se vyjádří v logaritmických hodnotách a vynese se do grafu, kde nezávisle proměnnou je logaritmus koncentrace (osa x) a závisle proměnnou % inhibice (osa y). Body se proloží přímkou a z průsečíku se souřadnicí inhibice 50 %

se spustí kolmice na osu x, odečte se hodnota log c. Následným odlogaritmováním získáme hledanou koncentraci IC50.

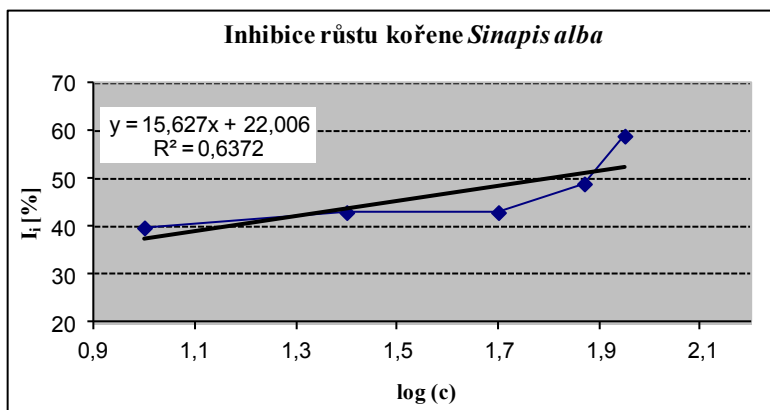
V této studii byl testován vzorek meziprojektu syntetického barviva Disperse blue 3 odebraného z bioreaktoru v průběhu biodegradace. Ze vzorku a ředící vody byla připravená koncentrační řada: 10%, 25%, 50%, 75%, a 90%. Jako kontrola sloužila ředící voda bez přítomnosti testované látky. Každá koncentrace byla provedena ve dvou paralelních stanoveních.

### Výsledky a diskuse

Disperse blue 3 způsobuje 50% inhibici růstu kořene *Sinapis alba* při koncentraci 425,314 mg/l. Do bioreaktoru je barvivo aplikováno v koncentraci 150 mg/l, při které vyvolává 20% inhibici růstu kořene. Vzorek meziprojektu odebraný z bioreaktoru v průběhu biodegradace houbou *Pleurotus ostreatus* způsoboval 59% inhibici růstu kořene (Tab. 2, Graf 1). Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že vzorek meziprojektu vykazoval vyšší akutní toxicitu než na vstupu do bioreaktoru. Tento efekt byl rovněž pozorován při biodegradaci barviva Diperze blue 3 houbou *Irpex lacteus*, kdy při nejvyšší koncentraci byla inhibice růstu kořene *Sinapis alba* 48% [7].

**Tabulka 2.** Hodnoty inhibice růstu kořene *Sinapis alba* u meziprojektu Disperse blue 3

Koncentrace	kontrola		10%		25%		50%		75%		90%	
$\Sigma$ délek kořenů [mm]	843,5	683	400,5	515,5	417,5	452	357	512	380	396,5	303	328,5
$\bar{\phi}$	25,4		15,3		14,5		14,5		13		10,5	
I%	0		39,8		43		43		49		59	



**Graf 1.** Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* u meziprojektu Disperse blue 3

Platnost testu je splněna, pokud je klíčivost semen v kontrole minimálně 90%. Tomu jsme napomohli předklíčením semen, neboť se tím vyloučila semena, která ztratila svou schopnost klíčit nebo jsou již stará. I přesto semena, která vyklíčila, ale nevytvořila kořen, jsou počítána jako nulová. V našem testu byly veškeré podmínky splněny.

Konečný produkt z bioreaktoru zatím nebyl testován, lze však předpokládat na základě výsledků testů biodegradace DB3 pomocí houby *Irpex lacteus*, postupný pokles toxických účinků. Biodegradace barviva pomocí ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* probíhala rychleji než v předchozích experimentech za použití houby rodu *Irpex lacteus* [7].

## Závěr

Provedenou biodegradací pomocí ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* došlo u odebraného vzorku meziprojektu Disperse blue 3 ke zvýšení toxicity oproti vstupní koncentraci barviva (150 mg/l), což bylo ověřováno testem na semenech *Sinapis alba*. Podobné výsledky vykazoval meziprodukt při použití houby rodu *Irpex lacteus*.

Dalšími kroky v tomto experimentu bude hodnocení konečného produktu z reaktoru po biodegradaci DB3 houbou *Pleurotus ostreatus*. Dále se předpokládá provedení testu akutní toxicity vzorků pomocí mikrobiotestu Phytotoxkit jak na semenech *Sinapis alba*, tak na dalších typech semen doporučených pro tento typ testu a také provedení kontaktního testu toxicity na chvostoskocích a tím ověření citlivosti tohoto organismu.

## Poděkování

Článek byl vypracován v rámci projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR a projektu SGS 19/PřF/2012 Studium faktorů ovlivňujících průběh biodegradčních procesů syntetických barviv.

## Literatura

- [1.] TIGINI, V., GIASANTI, P., MANGIAVILLANO, A., PANNOCCHIA, A., VARESE, G. C., *Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests*. In: Ecotoxicology and Environmental Safety 74 (2011) 866–873
- [2.] RANI, CH., JANA, A. K., and BANSAL, A., *Studies on the Biodegradation of Azo Dyes by White Rot Fungi Phlebia Radiata*. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENERGY AND ENVIRONMENT MARCH 19–21, 2009, ISSN: 2070–3740
- [3.] NOVOTNÝ, Č., SVOBODOVÁ, K., KASINATH, A., ERBANOVÁ, P., *Biodegradation of synthetic dyes by Irpex lacteus under various growth conditions*. In: International Biodeterioration & Biodegradation 54 (2004) 215 – 223
- [4.] ŠUŠLA, M., SVOBODOVÁ, K., *Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů*. In: Chem. Listy 100, 889–895 (2006)
- [5.] KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A., *Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba*. In: Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT Praha 2011, <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm> [online]
- [6.] MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ ČESKÉ REPUBLIKY Odbor odpadů: *Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů*, Praha, únor 2007
- [7.] MALACHOVÁ, K., RYBKOVÁ, Z., SEZIMOVÁ, H., NOVOTNÝ, Č., ČERVEŇ, J., TVARDKOVÁ, M., JASKOOVÁ, Z., HASAL, P., POCEDIC, J., *Toxicity changes during biodegradation of synthetic dyes by Irpex lasteus*. In: CURR OPIN BIOTECH, 2011, sv. 22, s. 75–76.

## Abstract

The aim of this study is to determine the toxic effects of synthetic colors Disperse Blue 3 and its biodegradation products of root growth inhibition test on *Sinapis alba* seeds. Inhibition of growth of *Sinapis alba* root is evaluated after 72 hours of incubation in the thermostat. With the concentration series is set inhibitory effect of sample as the IC50 value. Biodegradation is performed in a rotating disk bioreactor using ligninolytic mushrooms of the genus *Pleurotus ostreatus*. The intermediate sample was observed slightly higher toxicity than biodegradation by the fungus *Irpex lacteus*.